

Türkiye’de Kutanöz Leişmanyazis Hastalarından Elde Edilen *Leishmania* İzolatlarındaki Farklılıklar ve Bunların Fare Modeline Klinik Yansıması

Diversity of *Leishmania* Strains Isolated from Cutaneous Leishmaniasis Patients in Turkey and its Reflection to Clinics in Mice Model

Ahmet ÖZBİLGİN¹(ID), Gülnaz ÇULHA²(ID), Melda Zeynep GÜRAYS³(ID), Fadile Yıldız ZEYREK⁴(ID), Işın AKYAR⁵(ID), Seray TÖZ⁶(ID), İpek ÖSTAN URAL¹(ID), Özgür KURT⁵(ID), Tanıl KOCAGÖZ⁵(ID), İbrahim ÇAVUŞ¹(ID), Cumhur GÜNDÜZ⁷(ID)

¹ Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Manisa.

¹ Manisa Celal Bayar University Faculty of Medicine, Department of Parasitology, Manisa, Turkey.

² Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Hatay.

² Mustafa Kemal University Faculty of Medicine, Department of Parasitology, Hatay, Turkey.

³ İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Kimya Bölümü, İzmir.

³ Izmir Institute of High Technology, Department of Chemistry, Izmir, Turkey.

⁴ Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Şanlıurfa.

⁴ Harran University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Sanliurfa, Turkey.

⁵ Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

⁵ Acibadem University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Istanbul, Turkey.

⁶ Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, İzmir.

⁶ Ege University Faculty of Medicine, Department of Parasitology, Izmir, Turkey.

⁷ Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İzmir.

⁷ Ege University Faculty of Medicine, Department of Medical Biology, Izmir, Turkey.

Makale Atfı: Özbilgin A, Çulha G, Güray MZ, Zeyrek FD, Akyar I, Töz S ve ark. Türkiye’de kutanöz leişmanyazis hastalarından elde edilen *Leishmania* izolatlarındaki farklılıklar ve bunların fare modeline klinik yansıması. Mikrobiyol Bul 2020;54(3):429-443.

ÖZ

Yıllardır eşeysiz ürediği bilinen *Leishmania* türlerinin, yakın zamanda aralarında genetik madde alış-verişi yapabildikleri gösterilmiş, bu şekilde farklı türleri ait hibrit özellikli parazitlerin ortaya çıkabildiği bildirilmiştir. Üç kıtanın ortasında kavşak pozisyonundaki ülkemizde de hibrit suşlar bulunabileceği düşünülmektedir. Ülkemizde *Leishmania infantum*’un neden olduğu visceral leişmanyazis daha az görülürken, *Leishmania tropica*’nın ve *L.infantum*’un sebep olduğu kutanöz leişmanyazis (KL)’te halen yılda 2500 civarında olgu bildirilmektedir. Çalışmamızda yerli *Leishmania* türlerindeki genetik çeşitliliği araştırmak ve Türkiye’de hibrit *Leishmania* suşları bulunup bulunmadığını incelemek amaçlanmıştır. KL etkeninin *L.tropica* olduğu Şanlıurfa ile hem *L.tropica* hem de *L.infantum*’un etken olduğu Hatay çalışma için seçilmiş ve bu şehirlerde KL tanısı alan onar hasta çalışmaya alınmıştır. Tüm izolatlar gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Rt-PCR), izoenzim analizi, iki boyutlu jel elektroforezi ve MALDI-TOF/TOF-MS ile incelen-

İletişim (Correspondence): İbrahim Çavuş, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Dekanlık Binası 2. Kat Uncubozköy-Yunusemre, Manisa, Türkiye.

Tel (Phone): +90 505 318 1491, **E-posta (E-mail):** icvs26@yahoo.com

miş, farklı bulunan proteinler gen dizi analizleriyle doğrulanmış ve farelerle in vivo çalışmalar yapılmıştır. Şanlıurfa’daki 10 izolatın tümünün sadece deri enfeksiyonu oluşturan *L.tropica* olduğu saptanmıştır. Buna karşılık, Hatay’dan alınan 10 izolattan birinin farelerde yalnız deri enfeksiyonu oluşturabilen *Leishmania major* olduğu gözlenmiştir. Beş izolatın ise Rt-PCR ve dizi analiziyle *L.tropica* olduğu belirlenmiştir. Bu beş izolatın birinde *L.tropica* referans izolatından farklı bir protein bulunmuş, bu izolatın farelerde yalnız deri tutulumu ile seyreden bir klinik tablo oluşturduğu izlenmiştir. Beş izolatın dördünde ise *L.tropica* referans izolatından beş farklı proteinin bulunduğu ve farelerde hem deri hem de iç organ tutulumuna neden oldukları gösterilmiştir. Geriye kalan dört izolatın Rt-PCR’de *L.tropica* ve *L.infantum* ile uyumlu çift erime eğrisi sergilediği, dizi analizi ve izoenzim analizine göre *L.infantum* olduğu, *L.infantum* referans izolatına göre altı farklı proteinin bulunduğu ve farelerde hem deri hem iç organ tutulumuna neden olabildiği gösterilmiştir. Farklı proteinlere sahip izolatların hibrit *Leishmania* türleri olduğu kanısına varılmıştır. Çalışmada ülkemizden elde edilen KL etkeni izolatların proteomik, genomik, hayvan modellerinde oluşturacakları doku tropizmi ve klinik tabloları konularında alınan sonuçlar ilk kez birlikte değerlendirilmiştir. Ülkemizde KL etken olarak bulunan *L.tropica* ve *L.infantum* ek olarak ilk kez KL etkeni *L.major* izole edilmiştir. Türkiye’de *L.infantum/tropica* hibritleri olabileceği gösterilmiştir.

Anahtar kelimeler: *Leşmanyazis; hibrit; gen; proteomik; Türkiye.*

ABSTRACT

Although asexual reproduction has been attributed to *Leishmania* species, genetic exchange has recently been demonstrated, which helped emerging of hybrid isolates. Situated on the crossroads between three continents, *Leishmania* hybrids may be present in Turkey. In Turkey, visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is less common, while cutaneous leishmaniasis (CL) caused by *Leishmania tropica* and *L.infantum* could reach 2500 reported cases a year. Our aim was to investigate genetic variability of local *Leishmania* species and presence of hybrid *Leishmania* strains in Turkey. Twenty CL patients from Sanliurfa and Hatay, where only *L.tropica* and both *L.tropica* and *L.infantum* cause CL, respectively, were registered equally. All isolates were assessed with real-time polymerase chain reaction (Rt-PCR), isoenzyme analysis, gene sequencing, two-dimensional gel electrophoresis (2D-PAGE) and MALDI-TOF/TOF-MS followed by in vivo analyses on mouse model. Identification of differentially expressed proteins was performed. These proteins were confirmed by sequence analysis. All isolates from Sanliurfa were found to be *L.tropica* which caused cutaneous infection in mice. However, one of 10 isolates from Hatay was found as *Leishmania major* which caused cutaneous infection. Five isolates were found as *L.tropica* with Rt-PCR and gene sequencing, one of which had one different protein from the reference *L.tropica* strain and caused cutaneous infection. Four of the five isolates had five different proteins compared to reference strain and caused both cutaneous and visceral infections. Remaining four isolates showed double melting curves in Rt-PCR, which were concordant with *L.tropica* and *L.infantum*. Their sequencing and isoenzyme analyses indicated them as *L.infantum*. They had six different proteins compared to reference *L.infantum* strain and caused cutaneous and visceral infections. It is concluded that the isolates with different proteins were hybrid *Leishmania* species. In the present study, outcomes of the proteomics, genomics, clinical manifestations and tissue tropism on animal models were evaluated together for the first time. In addition to *L.tropica* and *L.infantum*, *L.major* was identified as a causative agent for CL and hybrids of *L.infantum/tropica* were also shown to be present.

Keywords: *Leishmaniasis; hybrid; gene; proteomics; Turkey.*

GİRİŞ

Leşmanyazis, insanlarda çoğu tropik veya subtropik bölgelerde olmak üzere dört kıtada toplam 98 ülke veya bölgede endemik olarak görülmektedir. Endemik bölgelerde yaşayan bir milyardan fazla insanın risk altında olduğu düşünülmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), her yıl viseral leşmanyazis (VL) tanısı konan tahmini 50.000-90.000 yeni

olguyu ortaya çıktığını ve yılda tahmini 26.000-65.000 ölüm meydana geldiğini bildirmektedir. Ayrıca her yıl kutanöz leşmanyazis (KL) tanısı konan 700.000-1.000.000 yeni olgu olduğu bildirilmektedir¹.

Leishmania parazitleri Türkiye'de iki farklı klinik forma neden olmaktadır; KL (yılda > 2500 olgu) ve VL (yılda > 40 olgu). Türkiye'de KL etkenleri *Leishmania tropica* ve *Leishmania infantum*, VL etkeni ise *L.infantum*'dur².

Leşmanyaziste klinik olarak üç farklı tablo ortaya çıkmaktadır: (i) VL (Kala Azar, iç organlar leşmanyazisi, kara hastalık, karahumma, öldüren ateş, tropikal splenomegali); en ciddi şeklidir ve tedavi edilmediğinde %90 ölümle sonuçlanmaktadır, (ii) KL (lokal KL, deri leşmanyazisi, KL, şark çıbanı, güzellik çıbanı, Halep çıbanı), (iii) Mukokutanöz leşmanyazis (ML) daha sonraları, (iv) Yaygın kutanöz leşmanyazis, (v) Kala Azar sonrası dermal leşmanyaziste bu gruplara eklenmiştir³.

Tanıda ilk aşamayı klinik tanı oluşturmakta ve önemli bir yer tutmaktadır. Türkiye'de VL ve KL tanıları klasik olarak kemik iliği ve deri lezyonundan hazırlanan Giemsa boyalı yayma preparatların mikroskopik bakışı ile konulmaktadır. Parazit izolasyonu için NNN besiyeri ve mikrokültür yöntemleri uygulanmaktadır. In-house olarak hazırlanan IFAT ile tanı belirli merkezlerde gerçekleştirilmektedir. rK39 hızlı tanı testi ticari olarak satılmakta olup son yıllarda giderek daha fazla sayıda merkezde kullanılırken, moleküler tanı yöntemleri henüz araştırma amaçlı olarak kullanılmaktadır. Ayrıca tanı, deney hayvanı inokülasyonlarından da yapılabilmektedir⁴⁻⁷.

Son yıllarda *Leishmania* türlerinin hibritler oluşturabileceği hakkında elde edilen bulgularda ve bu konuda moleküler yöntemlerle yapılan analizlerde genetik çeşitliliğin ileri düzeyde olduğu görülmüş, tanımlanmış türlerin geçerli olmadığı ve bu nedenle taksonominin yeniden yapılanması gerektiği belirtilmiştir⁸.

Leishmania parazitlerinin çeşitliliğinin mutasyonların sonucu olduğu düşünülmekteydi, oysa yeni bulgular, doğada bulunan bazı izolatlarda eşeyli rekombinasyon oluştuğunun kanıtlarını ortaya koyarak bu görüşü geçersiz kılmaktadır. Ayrıca, doğada bulunan *Leishmania*'larda genetik madde değişiminin sürekli olarak meydana geldiği, türler arası ve türler içi hibritler ve rekombinant genotipler oluştuğu saptanmıştır. Günümüzde genetik madde değişimi sadece *Leishmania* türleri için değil insanda enfeksiyon yapan ve *Leishmania* gibi kinetoplastit grubunda yer alan *Trypanosoma* türleri için de bildirilmektedir. *Leishmania*'da gözlenen genetik madde değişiminin; leşmanyazisin başta epidemiyolojisi, biyolojisi, patolojisi, kliniği, tanısı, tedavisi ve korunma yollarının yanı sıra *Leishmania* parazit türleri açısından da önemli olduğu vurgulanmaktadır⁸⁻¹¹.

Bu çalışmada, ülkemizde elde edilen KL etkeni izolatların proteomik, genomik, hayvan modellerinde oluşturacakları doku tropizmi ve klinik tabloları konuları birlikte değerlendirilerek hibrit türlerinin olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu onayı (Tarih: 31.01.2011 ve Karar no: 0023) ve Ege Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu onayı (Tarih: 28.01.2011 ve Karar no: 006) ile gerçekleştirildi.

Çalışma Alanları ve Kutanöz Leishmanyazis Hastaları

Sağlık Bakanlığı Bulaşıcı Hastalıklar Bildirim Sisteminin 2005-2008 yılları arasındaki verileri dikkate alınarak KL olgularının yoğun olarak görüldüğü Şanlıurfa (n= 2150) ve Hatay (n= 451 KL, n= 5 VL) illeri çalışma alanları olarak belirlendi.

Şanlıurfa ilindeki KL olgularında etken *Leishmania* türü *L.tropica* iken, Hatay ilinde etken *L.tropica* ve *L.infantum*'dur^{2,12}. Her iki ilden de onar olmak üzere toplamda 20 KL hastasından *Leishmania* izolatları elde edilerek proje çalışmasında kullanıldı. Ayrıca çalışmada kriyoprezervasyon yapılarak sıvı azotta saklanan dört uluslararası referans *Leishmania* kontrol izolatu [*L.tropica* (MHOM/AZ/1974/SAF-K27), *Leishmania major* (MHOM/SU/1973/5ASKH), *L.infantum* (MHOM/TN/1980/PT1), *Leishmania donovani* (MHOM/IN/1980/DD8)] de kullanıldı.

Hastadan Örnek Alınması

Deriden alınan klinik örneklerden öncelikle ince yayma preparatlar hazırlanıp Giemsa ile boyanarak mikroskop altında *Leishmania* amastigotları araştırıldı. Deriden alınan klinik örnek, NNN ile süt ve karaciğer ekstresi eklenerek zenginleştirilmiş NNN besiyerine (Z besiyeri) *Leishmania* izolasyonu için ekildi. Klinik örneğin bir kısmı moleküler yöntemlerde kullanılmak üzere RPMI 1640 içerisinde -20°C'de saklandı.

İzoenzim Analizi

KL hastalarından elde edilen 20 adet *Leishmania* izolatının izoenzim analizleri, Fransa Montpellier'de bulunan DSÖ *Leishmania* Referans Merkezinde gerçekleştirildi.

Leishmania İzolatlarında Uygulanan Moleküler Testler

DNA izolasyonu: Hazırlanan tüm izolatlardan ve yayma preparatlardan "Roche High Pure PCR Template Preparation Kit" ile DNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen ürünler -20°C'de saklandı.

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Rt- PCR): DNA izolasyonu sonucu elde edilen ürünlere ITS1 probu kullanılarak Rt-PCR testi uygulandı¹³.

İzolatların Deney Hayvanlarındaki Modellerde Klinik Yansımalarının İncelenmesi ve Enfeksiyonların Takibi

Hayvan modelleri: Hayvan modellerinin geliştirilmesinde Balb/C cinsi fareler ve hastalardan alınarak besiyerlerine inokülasyonu yapılan, sıvı besiyerinde çok sayıda üretilen *Leishmania* izolatları kullanıldı. Çalışma bölgelerinden izole ettiğimiz her bir *Leishmania* izolatu besiyerlerinde üretildikten sonra sabit fazda kültürden alınıp her birinde 6 adet

farenin bulunduğu intravenöz (IV) ve subkutan (SC) deney gruplarındaki farelere enjekte edildi. Fareler dişi, 5-7 haftalık ve 20-25 g ağırlığında olup ve ad libitum olarak beslendi.

Leşmanyazis modeli oluşturmak için kullanılan promastigotlar, 10 ml kültür sıvısının 1500 devirde 10 dakika santrifüjlenip, dipte kalan çökeltinin steril serum fizyolojik ile üç kez yıkanmasıyla elde edildi. Promastigot süspansiyonunun son konsantrasyonu 1×10^8 promastigot/ml olacak şekilde mikroskopta sayılarak ayarlandı.

a. SC deney grupları için; farelerin ayak tabanı bölgesinde deri altına 150 µl promastigot solüsyonu enjekte edildi ve inokülasyonun ikinci haftasında ayak tabanında kızarıklık ve şişme olan farelerin lezyonlarının genişliği ve deriden yüksekliği mikrometrik ölçüm aleti ile haftalık olarak ölçüldü. Ölçüme 6 ay boyunca devam edildi. Sağlam doku sınırından tüberkülin enjeksiyonu ile serum fizyolojik verilip aspire edilerek alınan örneklerden NNN besiyerlerine ekim yapıldı. Giemsa ile boyanarak incelenen preparatlarda *Leishmania* amastigotlarının varlığı araştırıldı^{14,15}. Böylelikle yerli *Leishmania* suşları kullanılarak farede KL hayvan modeli oluşturuldu.

b. IV deney grupları için; *Leishmania* izolatlarının promastigot çözeltisi 150 µl IV olarak farenin kuyruk veninden verildi. Farelere promastigotların verilmesinden 30 gün sonra otopsi yapılarak karaciğer ile dalakları çıkarıldı. Örneklerden NNN besiyerlerine ekim yapıldı. Hazırlanan preparat Giemsa ile boyanarak incelendi ve *Leishmania* amastigotlarının varlığı araştırıldı¹⁶.

Her deney grubunda 6 adet fareden oluşmuş 20 izolat grubu ile çalışıldı. Ayrıca yukarıdaki yöntemlerin yanı sıra deney hayvanlarından alınan organ ve dokularda (karaciğer, dalak, ayak tabanı) Rt-PCR yöntemi ile de parazit varlığı araştırıldı. Bu şekilde yeni elde edilen izolatların fare modelindeki davranışları (viserotropik, dermatotropik, dermo-viserotropik) belirlenmeye çalışıldı.

***Leishmania* İzolatlarında Proteomik ve Genomik Araştırmalar**

Hatay ve Şanlıurfa illerinden elde edilen 20 adet izolatın ve 4 adet referans izolatın proteinleri izole edilerek 2D-PAGE ile protein profilleri oluşturuldu. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra protein spotları Coomassie Brilliant Blue boyama tekniği ile görünür hale getirildi. Örneklerin jel görüntüleri karşılaştırıldı ve ifadenme düzeyinde farklılık olduğu belirlenen protein spotları jellerden kesildi. Protein spotları tripsin enzimi ile muamele edilerek ilgili proteinlere ait peptitler oluşturuldu ve bu peptitler MALDI-TOF/TOF-MS ile analiz edildi. Elde edilen veriler Mascot Server (V2.4, Matrix Science) yardımıyla NCBI (National Center for Biotechnology Information, www.ncbi.nlm.nih.gov) protein veri tabanı taranarak, ilgili proteinlerin tanımlanması sağlandı. Kesimi yapılan proteinlerden veri tabanı taramasında eşleşme verenler gi numaraları ile işaretlenerek, proteine ait detaylı bilgi alındı. İki boyutlu jel elektroforez analizi ve MALDI-TOF ile farklılığı saptanan proteinlere ait gen bölgelerinin dizi analizleri gerçekleştirildi. Elde edilen diziler, NCBI (National Center for Biotechnology Information, www.ncbi.nlm.nih.gov) veri tabanında blast programıyla karşılaştırıldı.

BULGULAR

Proje kapsamında Şanlıurfa ve Hatay illerinden onar olmak üzere toplamda 20 KL hastasından *Leishmania* izolatları elde edilmiştir (Tablo I). İzolatların farelerde oluşturduğu klinik tablo, hastanın klinik materyalinden ve besiyerinde üretilen promastigotlardan yapılan ITS1 problu Rt-PCR sonucu, fare materyalinden Giemsa ile boyalı preparatların inceleme sonuçları, fare materyalinden yapılan ekimlerin besiyeri değerlendirmeleri, izolatların gen dizi ve izoenzim analizleri Tablo II'de detaylı olarak verilmiştir.

Sadece *L.tropica*'nın etken olduğu KL olgularının görüldüğü Şanlıurfa ilinden elde edilen izolatların sadece dermatropik davranış gösterdiği ve fare ayak tabanında KL oluşturduğu saptanmıştır (Resim 1). *L.major* olarak genotiplendiğimiz izolatın hayvan modelinde dermatropik davranış göstererek sadece deriye yerleştiği, çok hızlı ve açık yaralarla karakterize diğer türlere göre agresif bir KL oluşturduğu saptanmıştır (Resim 2). *L.infantum* ve *L.tropica*'nın KL etkeni olduğu Hatay ilinden elde edilen izolatların ise fare modelinde dermatropik ve dermo-viserotropik davranış gösterdiği, hem kutanöz lezyonlar oluşturduğu hem de lenfadenopati, tüy dökülmesi, zayıflama ile kendini belli eden VL oluşturduğu saptanmıştır (Resim 3). Farelerin otopsislerinde kontrol grubuna göre dalak ve karaci-

Tablo I. Çalışmada Kullanılan İzolatlar

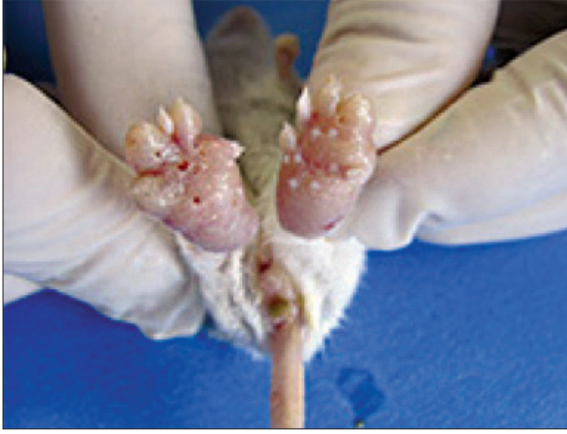
İzolatların kodu	Elde edildiği il
MHOM/TR/2012/HU19	Şanlıurfa
MHOM/TR/2012/HU24	Şanlıurfa
MHOM/TR/2012/HU20	Şanlıurfa
MHOM/TR/2013/HU41	Şanlıurfa
MHOM/TR/2012/HU31	Şanlıurfa
MHOM/TR/2012/HU26	Şanlıurfa
MHOM/TR/2013/HU38	Şanlıurfa
MHOM/TR/2012/HU27	Şanlıurfa
MHOM/TR/2013/HU40	Şanlıurfa
MHOM/TR/2013/HU29	Şanlıurfa
MHOM/TR/2012/MK03	Hatay
MHOM/TR/2012/MK08	Hatay
MHOM/TR/2012/MK04	Hatay
MHOM/TR/2012/MK09	Hatay
MHOM/TR/2012/MK05	Hatay
MHOM/TR/2013/MK10	Hatay
MHOM/TR/2012/MK06	Hatay
MHOM/TR/2013/MK11	Hatay
MHOM/TR/2013/MK32	Hatay
MHOM/TR/2013/MK33	Hatay

Tablo II. İzolatların Farelerde Oluşturduğu Klinik Tablo, Besiyerindeki ve Klinik Materyaldeki Genotiplerini, Fare Materyalindeki Tanı Yöntemleri Sonuçları, Gen-Dizi Analizleri, İzozimlerini Sonuçları

İzolat kodu	Farede klinik	Klinik örnek (yara sürüntüsü) Gerçek zamanlı ITS1 PCR	Besiyeri Gerçek zamanlı ITS1 PCR	Fare örneği Giemsa smear	Fare örneği NNN besiyeri	Gen-dizi analizi	İzozim
MHOM/TR/2012/HU19	DT	<i>L. tropica</i>	<i>L. tropica</i>	KL+	KL+	<i>L. tropica</i>	MON-7
MHOM/TR/2012/HU20	DT	<i>L. tropica</i>	<i>L. tropica</i>	KL+	KL+	<i>L. tropica</i>	MON-7
MHOM/TR/2012/HU31	DT	<i>L. tropica</i>	<i>L. tropica</i>	KL+	KL+	<i>L. tropica</i>	MON-7
MHOM/TR/2012/HU38	DT	<i>L. tropica</i>	<i>L. tropica</i>	KL+	KL+	<i>L. tropica</i>	MON-7
MHOM/TR/2012/HU40	DT	<i>L. tropica</i>	<i>L. tropica</i>	KL+	KL+	<i>L. tropica</i>	MON-7
MHOM/TR/2012/HU24	DT	<i>L. tropica</i>	<i>L. tropica</i>	KL+	KL+	<i>L. tropica</i>	MON-7
MHOM/TR/2012/HU41	DT	<i>L. tropica</i>	<i>L. tropica</i>	KL+	KL+	<i>L. tropica</i>	MON-7
MHOM/TR/2012/HU26	DT	<i>L. tropica</i>	<i>L. tropica</i>	KL+	KL+	<i>L. tropica</i>	MON-7
MHOM/TR/2012/HU27	DT	<i>L. tropica</i>	<i>L. tropica</i>	KL+	KL+	<i>L. tropica</i>	MON-7
MHOM/TR/2012/HU29	DT	<i>L. tropica</i>	<i>L. tropica</i>	KL+	KL+	<i>L. tropica</i>	MON-7
MHOM/TR/2012/MK32	DT	<i>L. major</i>	<i>L. major</i>	KL+	KL+	<i>L. major</i>	MON-103
MHOM/TR/2012/MK11	DT	<i>L. tropica</i>	<i>L. tropica</i>	KL+	KL+	<i>L. tropica</i>	MON-312
MHOM/TR/2012/MK08	DT/VT	<i>L. infantum/tropica</i> 2 pik	<i>L. infantum/tropica</i> 2 pik	VL ve KL+	VL ve KL+	<i>L. infantum</i>	MON-319*
MHOM/TR/2012/MK33	DT/VT	<i>L. infantum/tropica</i> 2 pik	<i>L. infantum/tropica</i> 2 pik	VL ve KL+	VL ve KL+	<i>L. infantum</i>	MON-319*
MHOM/TR/2012/MK10	DT/VT	<i>L. infantum/tropica</i> 2 pik	<i>L. infantum/tropica</i> 2 pik	VL ve KL+	VL ve KL+	<i>L. infantum</i>	MON-319*
MHOM/TR/2012/MK05	DT/VT	<i>L. infantum/tropica</i> 2 pik	<i>L. infantum/tropica</i> 2 pik	VL ve KL+	VL ve KL+	<i>L. infantum</i>	MON-1
MHOM/TR/2012/MK03	DT/VT	<i>L. tropica</i>	<i>L. tropica</i>	VL ve KL+	VL ve KL+	<i>L. tropica</i>	MON-7
MHOM/TR/2012/MK04	DT/VT	<i>L. tropica</i>	<i>L. tropica</i>	VL ve KL+	VL ve KL+	<i>L. tropica</i>	MON-54
MHOM/TR/2012/MK06	DT/VT	<i>L. tropica</i>	<i>L. tropica</i>	VL ve KL+	VL ve KL+	<i>L. tropica</i>	MON-54
MHOM/TR/2012/MK09	DT/VT	<i>L. tropica</i>	<i>L. tropica</i>	VL ve KL+	VL ve KL+	<i>L. tropica</i>	MON-313

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu, DT: Dermotropik, DT/VT: Dermo-viserotropik, KL: Kutanöz leşşmanyazis, VL: Viserel leşşmanyazis.

* İlik kez tanımlanan izozim.



Resim 1. *Leishmania tropica*'nın fare ayak tabanında oluşturduğu kutanöz lezyonlar.



Resim 2. *Leishmania major*'ün fare ayak tabanında oluşturduğu kutanöz lezyonlar.



Resim 3. Farede dermo-viserotropik yerleşimde lenfadenopati ve kutanöz lezyonlar

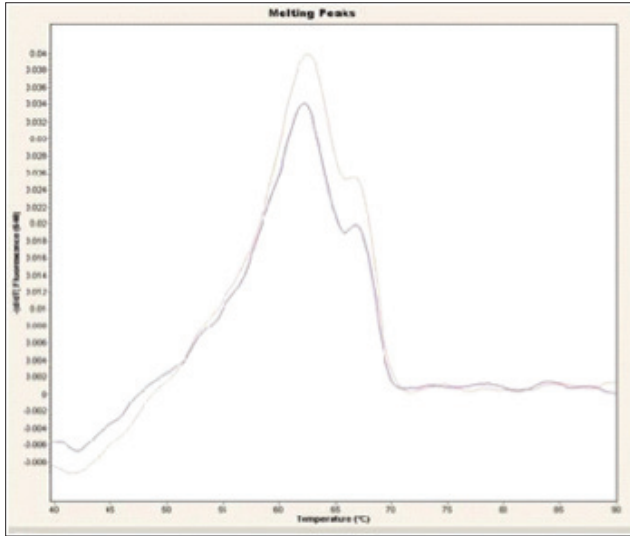
ğerlerinin büyüdüğü gözlenmiştir. Her iki organdan yapılan ve Giemsa ile boyalı yayma preparatlarda amastigotlar görülmüş ve zenginleştirilmiş besiyerlerine yapılan ekimlerde promastigotlara rastlanılmıştır. İzolatların faredede oluşturduğu klinik tabloyla ilgili detaylar Tablo II'de verilmiştir.

Leishmania parazitinin ITS1 bölgesine özgü tasarladığımız primer ve problemler ile Rt-PCR yardımıyla tür tanımlamasına yönelik çalışmalar sırasında Hatay ilinden 4 KL hastasından elde edilen izolat ve yayma örneklerinin hem *L.tropica* hem de *L.infantum*'a uygun erime eğrisi gösterdiği saptanmıştır (Şekil 1). Ancak yapılan gen dizi analizleri ve izoenzim analizlerinde bu izolatlar *L.infantum* olarak değerlendirilmiştir. Bu izolatların protein profili referans izolatı olan *L.infantum* (MHOM/TN/1980/IPT1) ile büyük benzerlikler göstermiş fakat bu 4 izolatta yapılan proteomik ve genomik araştırmalar sonucunda farklı 6 protein saptanmıştır (Şekil 2, Tablo III). Farklı bulunan proteinlere yapılan gen dizi analizlerinde, *L.infantum* ve *L.tropica*'ya ait genomik yapıya sahip oldukları görülmüştür.

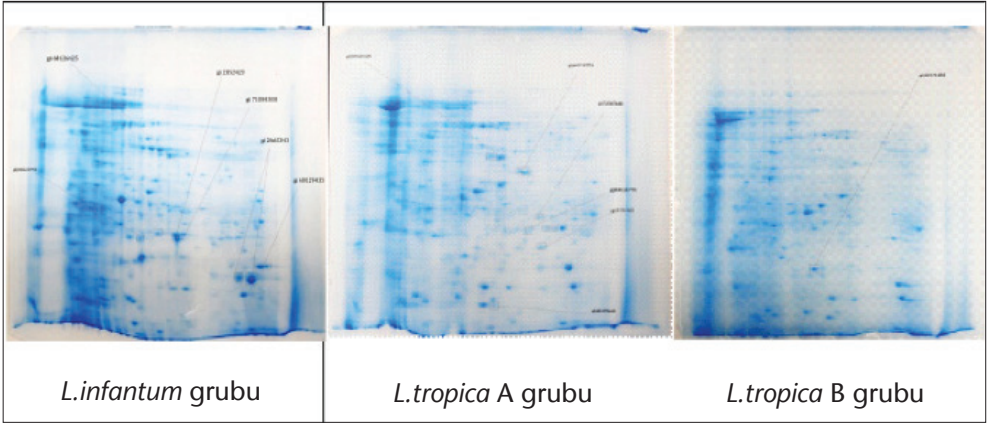
Bu izolatların *L.infantum/tropica* hibriti olduğu düşünülmüştür (Hatay ilimizden elde edilen izolatlar MHOM/TR/2012MK08, MHOM/TR/2012/MK33, MHOM/TR/2012/MK10, MHOM/TR/2012/MK05).

L.major (MHOM/TR/2012/MK32) olarak genotiplendirilen örneğin 2D-PAGE analizi sonucunda elde edilen protein profili ile referans izolat olarak kullanılan *L.major* (MHOM/SU/1973/5ASKH) protein profili benzer çıkmış ve protein farklılığı saptanmamıştır.

L.tropica olarak genotiplendirilen izolatların birbiriyle uyumlu protein profili gösteren 3 gruba ayrıldığı gözlenmiştir.



Şekil 1. ITS-1 bölgesine özgü Rt-PCR'de hem *Leishmania tropica* hem de *Leishmania infantum*'a uygun erime eğrisi.



Şekil 2. İki boyutlu jel elektroforez analizi sonuçları. İfade düzeyinde farklılık saptanan protein spotları işaretlenmiştir.

Tablo III. İzolat Gruplarında İki Boyutlu Jel Elektroforez Analizine Göre Farklılık Gösteren Proteinler

İzolat grubu	gi numarası	Protein ismi	Moleküler ağırlık (Da)
<i>L.infantum</i> grubu	gi 68126425	NADP-dependent alcohol dehydrogenase, putative	38345
	gi 2352423	Iron superoxide dismutase	21618
	gi 71084308	Peroxidoxin 1	21278
	gi 2665343	Cyclophilin	18811
	gi 68129435	Hypothetical protein, conserved	22576
	gi 68223993	RNA helicase, putative	49456
<i>L.tropica</i> A grubu	gi 68126425	NADP-dependent alcohol dehydrogenase, putative	38345
	gi 68223771	Methylthioadenosine phosphorylase, putative	33388
	gi 72547444	Short chain dehydrogenase	24859
	gi 2352423	Iron superoxide dismutase	21618
	gi 68129449	Hypothetical protein, conserved	74821
<i>L.tropica</i> B grubu	gi 68129435	Hypothetical protein, conserved	22576

L.tropica A grubu; referans izolat olarak kullanılan *L.tropica* (MHOM/AZ/1974/SAF-K27) proteinleri ile büyük benzerlik göstermiş fakat bu 4 izolatla yapılan proteomik araştırmalar sonucunda farklı 5 protein saptanmıştır (Şekil 2, Tablo III) (Hatay ilimizden elde edilen izolatlar MHOM/TR/2012/MK03, MHOM/TR/2012/MK04, MHOM/TR/2012/MK06, MHOM/TR/2012/MK09).

L.tropica B grubu; referans izolat olarak kullanılan *L.tropica* (MHOM/AZ/1974/SAF-K27) proteinleri ile uyumlu çıkmış fakat bu 4 izolatta yapılan proteomik ve genomik araştırmalar sonucunda farklı 1 protein saptanmıştır (Şekil 2, Tablo III) (Hatay ilimizden elde edilen izolat MHOM/TR/2012/MK11).

L.tropica C grubu; referans izolat olarak kullanılan *L.tropica* (MHOM/AZ/1974/SAF-K27) proteinleri ile uyumlu çıkmış ve protein farklılığı saptanmamıştır.

L.tropica izolatlarında farklı bulunan proteinlere yapılan gen dizi analizlerinde genomik yapıya ait fark da gözlenmiştir.

TARTIŞMA

VL, daha çok Ege ve Akdeniz bölgelerinde görülmekle birlikte, Türkiye’de tüm bölgelerimizden bildirilmiş olgular bulunmaktadır. Ülkemizde VL etkeninin, diğer Akdeniz Bölgesi ülkelerinde olduğu gibi genellikle *L.infantum*, KL etkeninin *L.tropica* olduğu izoenzim analizi ve moleküler yöntemlerle gösterilmiştir².

Doğada *Leishmania*’larda genetik madde değişiminin sürekli olarak meydana geldiği, türler arası ve türler içi hibritler ve rekombinant genotipler olduğu saptanmıştır. İdeal yaşam koşullarına sahip bir ortamda biyolojisini sürdüren parazit için eşeyli üremenin önemi olmayabileceği, ancak koşulların ağırlaşmasıyla genetik madde değişiminin hayatta kalmak için kaçınılmaz bir faktör olduğu bildirilmektedir. Hibridizasyon sayesinde parazitin yeni çevre koşullarına, vektörlere ve insan ile evcil hayvanlar dahil tüm konaklara adaptasyonunun mümkün olabileceği, yeni genotip özellikleri sayesinde canlılarda etkili bir şekilde yerleşip varlığını sürdürebileceği belirtilmektedir. Bugün deneysel düzeyde türler arası çaprazlamalarla yapılan ileri çalışmalar rutin işlemler olarak uygulanabilecek duruma getirilebilirse, parazitlerdeki virülans, patogenezi ve ilaç direncine ait önemli fenotipik belirleyicilerin haritalandırılmasının yapılabileceği vurgulanmaktadır. Bu yeni bulgulardan sonra leşmanyazisin başta taksonomisi, epidemiyolojisi, biyolojisi, patolojisi, kliniği, tanısı, tedavisi ve korunma yollarının yeniden gözden geçirilmesinin zorunlu olduğu bildirilmektedir^{10,11,17}.

Yapılan bir çalışmada *Leishmania*’nın doğal vektörü olan *Phlebotomus dubosqi* ve doğal olmayan vektörleri olan *Lutzomyia longipalpis*’te *L.major* suşlarının vektör içinde fakat hücre dışında genetik materyallerini kolayca birbirlerine aktarabildikleri görülmüştür. Bu çalışmaya göre metasiklik promastigotların ilk ortaya çıkmasından hemen önce görülen nektonomat safhasında hibritleşmenin gerçekleştiği bildirilmiştir. Hibritleşmenin sadece farklı türler arasında olmayıp aynı tür içinde de olabileceği bu nedenle doğada aynı türlerin kendi arasında hibritleşmesi ile ilaca dirençli genlerin aktarılarak dirençli suşların ortaya çıkabileceği bildirilmiştir¹⁸.

Etiyopya’nın güneyinden ve kuzeyinden olmak üzere birbirinden farklı iki bölgeden VL olgularından elde edilmiş 63 tane farklı *L.donovani* suşunun genetik materyalinde polimorfik mikrosatellit belirteçleriyle yapılan bir çalışmada iki grup arasında genetik

materyalin tamamen farklı olduğu HIV ile enfekte VL hastalarından elde edilen *L.donovani* izolatlarının birçoğunun tür içi hibritler olduğu bildirilmiştir¹⁹.

Yapılan başka bir çalışmada doğada *L.aethiopica* ve *L.donovani* arası genetik aktarım olarak hibritleşme olduğunu ve ortaya çıkan hibritlerin daha çok *L.aethiopica* benzediği bildirilmiştir²⁰. Bunun yanı sıra *L.infantum-L.major* hibritlerinin, *L.major*'e özgü vektörle etkili bir şekilde taşınabileceği ve bulaştırılabileceği saptanmıştır²¹.

Aldığımız tüm sonuçları analiz edip yorumladığımızda; *Leishmania* parazitinin ITS1 bölgesine özgü tasarladığımız primer ve probler ile Rt-PCR yardımıyla tür tanımlamasına yönelik çalışmalar sırasında Hatay ilinden dört KL hastasından elde edilen izolat ve yayma örneklerinin hem *L.tropica* hem de *L.infantum*'a uygun erime eğrisi gösterdiği saptanmıştır. Hayvan modelinde bu izolatların ise dermo-viserotropik davranış göstererek hem iç organlara hem de deriye yerleştiği derideki lezyonların bu dört izolatta benzer gelişim evresi ve büyüklüğü gösterdiği saptanmıştır. Bu izolatların protein profili referans izolatı olan *L.infantum* (MHOM/TN/1980/IPT1) ile büyük benzerlikler göstermiş fakat altı farklı protein saptanmıştır. Bu farklı protein içeriği, insanda *L.infantum* suşlarının dermatotropik davranış göstererek KL tablosunu oluşturmakta, modellerde ise dermo-viserotropik davranış göstererek VL ve KL tablosunu oluşturmakta etkili olduğunu akla getirmektedir. Bu izolatların *L.infantum/tropica* hibritleri olabileceği, insanda viseral yayılımı beklenirken KL etkeni olarak da klinik tablo oluşturabildiği düşünülmüştür. Ülkemizde KL etkeni olarak izole edilen ve *L.infantum* olarak genotiplenen diğer parazitlerin aslında *L.infantum/tropica* hibritleri olabileceği akla gelmiştir. Yapılan izoenzim analizlerinde de bu izolatlardan üç tanesinin izoenzimlerinin bugüne kadar tanımlanan *Leishmania* enzimlerinden farklı olduğu ve ilk kez saptandığı (MON-319), bir tanesinin *L.infantum* izoenzimi olan MON-1 olduğu görülmüştür. Farklı bulunan proteinlere yapılan gen dizi analizlerinde *L.infantum* ve *L.tropica*'ya ait genomik yapıya sahip oldukları görülmüştür.

Leishmania parazitinin ITS-1 bölgesine özgü tasarladığımız primer ve probler ile Rt-PCR yardımıyla tür tanımlamasına yönelik çalışmalar sırasında Hatay ilinden dört KL hastasından elde edilen izolatın yayma örneklerinin *L.tropica*'ya uygun erime eğrisi gösterdiği saptanmıştır. Hayvan modelinde bu izolatların dermo-viserotropik davranış göstererek hem iç organlara hem de deriye yerleştiği, derideki lezyonların bu dört izolata benzer gelişim evresi ve büyüklüğü gösterdiği saptanmıştır. Bu izolatların protein profili referans izolatı olan *L.tropica* (MHOM/AZ/1974/SAF-K27) ile büyük benzerlikler göstermiş fakat beş farklı protein saptanmıştır. Bu farklı protein içeriği modellerde dermo-viserotropik davranış göstererek VL ve KL tablosunu oluşturmakta etkili olduğunu akla getirirken, insanda *L.tropica* suşlarının viserotropik davranış göstererek VL tablosunu oluşturabileceği olasılığını düşündürmektedir. Bu izolatların viseral yayılım gösterebilen *L.tropica* varyant izolatları olabileceği ve insanda KL tablosu oluşturduğunu ancak farklı konakta viseral olarak VL tablosunu da oluşturabileceği düşünülmüştür.

Leishmania parazitinin ITS1 bölgesine özgü tasarladığımız primer ve probler ile Rt-PCR yardımıyla tür tanımlamasına yönelik çalışmalar sırasında Hatay ilinden bir KL has-

tasından elde edilen izolat (MHOM/TR/2012/MK11) ve yayma örneklerinin *L.tropica*'ya uygun erime eğrisi gösterdiği saptanmıştır. Hayvan modelinde bu izolatların dermatotropik davranış göstererek yalnız deriye yerleştiği saptanmıştır. Bu izolatin protein profili referans izolatu olan *L.tropica* (MHOM/AZ/1974/SAF-K27) ile büyük benzerlikler göstermiş fakat bir farklı protein saptanmıştır. Bu tek proteinlik farklılık modellerde viserotropik veya farklı bir davranış göstermesine neden olmamıştır. Bir proteinlik farkın parazite faredede visceral olarak yayılmaya neden olacak bir yetenek kazandırmadığını düşündürmektedir. Bu izolatin küçük bir proteinlik farklılığa sahip *L.tropica* varyantı olduğu düşünülmektedir.

Hatay yöresinde saptanan, Türkiye'nin lezyondan izole edilen ilk yerli *L.major*'e bağlı KL olgusudur. *Leishmania* parazitinin ITS1 bölgesine özgü tasarladığımız primer ve problemler ile Rt-PCR yardımıyla tür tanımlamasına yönelik çalışmalar sırasında Hatay ilinden bir KL hastasından elde edilen izolat (MHOM/TR/2012/MK32) ve yayma örneklerinin *L.major*'e uygun erime eğrisi gösterdiği saptanmıştır. Hayvan modelinde bu izolatin dermatotropik davranış göstererek sadece deriye yerleştiği çok hızlı ve açık yaralar ile karakterize diğer türlere göre agresif bir KL oluşturduğu saptanmıştır. Bu izolatin protein profilinin *L.major* referans izolatu olan (MHOM/SU/1973/5ASKH) ile paralellik gösterdiği saptanmıştır. Lezyon kısa sürede gelişerek doku kaybı ve bozuklukları ile seyreden bir prognoz göstermiştir. Bu izolatin *L.major* olduğu ve olgunun da insandaki ilk yerli *L.major* KL olgusu olduğu görülmüştür.

Leishmania parazitinin ITS1 bölgesine özgü tasarladığımız primer ve problemler ile Rt-PCR yardımıyla tür tanımlamasına yönelik çalışmalar sırasında Şanlıurfa ilinden 10 KL hastasından elde edilen izolatlar ve yayma örneklerinin *L.tropica*'ya uygun erime eğrisi gösterdiği saptanmıştır. Yapılan gen dizi analizlerinde bu izolatin *L.tropica*'ya uygun gen dizileri içerdiği görülmüştür. Hayvan modelinde bu izolatların dermatotropik davranış göstererek sadece deriye yerleştiği saptanmıştır. Bu izolatların *L.tropica* olduğu ve insanda KL tablosu oluşturduğu görülmüştür.

Sonuç olarak, sadece *L.tropica*'nın etken olduğu KL olgularının görüldüğü Şanlıurfa ilinden elde edilen izolatlar dermatotropik ve iki farklı türün (*L.infantum* ve *L.tropica*) KL etkeni olduğu Hatay ilinden elde edilen izolatların bir kısmının ise dermo-viserotropik davranış gösterdiği saptanmıştır. Bu bulgu ülkemizde de *L.infantum/tropica* hibritlerinin bulunabileceğini gösteren ilk bulgu olarak değerlendirilmiştir. Çalışmamız aynı bölgedeki *Leishmania* türlerinde protein profili ve genlerindeki bu farklılığı gösteren ve bu izolatların klinik modelde oluşturduğu farklı tabloların ortaya koyduğu bir ön çalışma olarak değerlendirilmiştir. Bu konuda daha net verilere ulaşmak için daha fazla örnekleri proteomik ve genomik araştırmaların yapılması gerektiğini düşünmekteyiz.

Bu hibritlerin varlığı, yerli *Leishmania* izolatları arasında doğada genetik madde alışverişi yapıldığının da göstergesidir. Doğada bulunan ve leşmanyazis için rezervuar olan canlıların araştırılması yanında saptanan protein farklılıklarının genotipik, proteomik ve sonrasında metabolik analizlerle ortaya konulmasının hibritleşme sürecinin anlaşılmasına katkıda bulunacağı, sonraki aşı çalışmaları için de altyapı sağlayabileceği düşünülmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmaya 111S179 nolu proje ile destek vererek gerçekleştirmemizi sağlayan TÜBİTAK’a, çalışma esnasında desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Talat Yalçın ve Prof. Dr. Yusuf Özbel’e, katkılarından dolayı Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Parazit Bankasına ve izoenzim analizlerinde bize destek olan DSÖ *Leishmania* Referans Merkezi-ne (Universite Montpellier Faculte de Medecine Laboratoire de Parasitologie, Montpellier, France) teşekkür ederiz.

ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu onayı (Tarih: 31.01.2011 ve Karar no: 0023) ve Ege Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu onayı (Tarih: 28.01.2011 ve Karar no: 006) ile gerçekleştirildi.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Leishmaniasis. Leishmaniasis fact sheet. World Health Organization, Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Erişim tarihi: 10 Aralık 2019.
2. Özbel Y, Özensoy Töz S. Leishmanosis, pp: 197-244. In: Özcel MA, Özbel Y, Ak M (eds), Özcel’in Tıbbi Parazit Hastalıkları. 2007, Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını, İzmir.
3. World Health Organization, WHO Technical Report Series 949. Control of the leishmaniasis. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, 2010, Geneva.
4. Gürel SG, Yeşilova Y, Ölgen KM, Özbel Y. Türkiye’de kutanöz leishmaniasisin durumu. Türkiye Parazit Derg 2012; 36(2): 121-9.
5. Özensoy Töz S, Chang KP, Özbel Y, Alkan MZ. Diagnostic value of RK39 dipstick in zoonotic visceral leishmaniasis in Turkey. J Parasitol 2004; 90(6): 1484-6.
6. Serin MS, Daglioglu K, Bagirova M, Allahverdiyev A, Uzun S, Vural Z, et al. Rapid diagnosis and genotyping of *Leishmania* isolates from cutaneous and visceral leishmaniasis by microcapillary cultivation and polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism of minixon region. Diag Microbiol Infect Dis 2005; 53(3): 209-14.
7. Ertabaklar H, Çalışkan SÖ, Boduç E, Ertuğ S. Kutanöz leishmaniyazis tanısında direkt mikroskopi, kültür ve polimeraz zincir reaksiyonu yöntemlerinin karşılaştırılması. Mikrobiyol Bul 2015; 49(1): 77-84.
8. Lukes J, Mauricio IL, Schönian G, Dujardin JC, Soteriadou K, Dedet JP, et al. Evolutionary and geographical history of the *Leishmania donovani* complex with a revision of current taxonomy. Proc Natl Acad Sci USA 2007; 104(22): 9375-80.
9. Akopyants NS, Kimblin N, Secundino N, Patrick R, Peters N, Lawyer P, et al. Demonstration of genetic exchange during cyclical development of *Leishmania* in the sandfly vector. Science 2009; 324(5924): 265-8.
10. Heitman J. Sexual reproduction and the evolution of microbial pathogens. Current Biology 2006; 16(17): R711-R25.
11. Miles MA, Yeo M, Mauricio IL. Genetics. *Leishmania* exploit sex. Science 2009; 324(5924): 187-9.
12. Özbilgin A, Töz S, Harman M, Günaştı Topal S, Uzun S, Okudan F, et al. The current clinical and geographical situation of cutaneous leishmaniasis based on species identification in Turkey. Acta Trop 2019; 190: 59-67.

13. El Tai NO, Osman OF, El Fari M, Presber W, Schönian G. Genetic heterogeneity of ribosomal internal transcribed spacer in clinical samples of *Leishmania donovani* spotted on filter paper as revealed by single-strand conformation polymorphisms and sequencing. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2000; 94(5): 575-9.
14. Yardley V, Croft SL. Animal models of cutaneous leishmaniasis, pp: 775-81. In: Zak O, Sande MA (eds), *Handbook of animal models of infection: Experimental models in antimicrobial chemotherapy*. 1999a. Academic Press, San Diego.
15. Girginkardeşler N, Balçioğlu IC, Yereli K, Özbiçin A, Özbel Y. Cutaneous leishmaniasis infection in Balb/C mice using a *Leishmania tropica* strain isolated from Turkey. *J Parasitol* 2001; 87(5): 1177-8.
16. Yardley V, Croft SL. Animal models of visceral leishmaniasis, pp: 783-7. In: Zak O, Sande MA (eds), *Handbook of animal models of infection: Experimental models in antimicrobial chemotherapy*. 1999b. Academic Press, San Diego.
17. Gibson W, Peacock L, Ferris V, Williams K, Bailey M. Use of yellow fluorescent hybrids to indicate mating in *Trypanosoma brucei*. *Parasites & Vectors* 2008; 1(1): 4.
18. Inbar E, Akopyants NS, Charmoy M, Romano A, Lawyer P, Elnaiem DEA, et al. The mating competence of geographically diverse *Leishmania major* strains in their natural and unnatural sand fly vectors. *Plos Genet* 2013; 9(7): e1003672.
19. Gelanew T, Kuhls K, Hurissa Z, Weldegebreal T, Hailu W, Kassahun A, et al. Inference of population structure of *Leishmania donovani* strains isolated from different ethiopian visceral leishmaniasis endemic areas. *Plos Negl Trop Dis* 2010; 4(11): e889.
20. Odiwuor S, De Doncker S, Maes I, Dujardin JC, Van der Auwera G. Natural *Leishmania donovani/Leishmania aethiopica* hybrids identified from Ethiopia. *Infect Genet Evol* 2011; 11(8): 2113-8.
21. Volf P, Benkova I, Myskova J, Sadlova J, Campino L, Ravel C. Increased transmission potential of *Leishmania major/Leishmania infantum* hybrids. *Int J Parasitol* 2007; 37(6): 589-93.